

10. Nuevas estrategias en la identificación de interacciones metabólicas durante el desarrollo de fármacos

MARÍA TERESA DONATO y MARÍA JOSÉ GÓMEZ-LECHÓN

1. RESUMEN

Una tarea clave en las etapas iniciales del desarrollo de nuevos fármacos es la caracterización exhaustiva de su perfil metabólico en el hombre, de la velocidad y grado de metabolización, de los enzimas involucrados en su metabolismo y de los posibles efectos inhibidores o inductores que el fármaco ejerce sobre los enzimas de biotransformación. La finalidad de estos ensayos preliminares es reducir al máximo el número de candidatos que se consideran aptos para ser sometidos a un desarrollo posterior. En la medida en que el número de moléculas a analizar ha ido aumentando en los últimos años, ha surgido la urgente necesidad de disponer de herramientas experimentales que permitan identificar y seleccionar, en el menor tiempo posible y con el mínimo coste, los mejores candidatos entre un gran número de compuestos diferentes. Dado que los estudios de metabolismo en animales no siempre son extrapolables al hombre, se está invirtiendo un gran esfuerzo en el desarrollo de modelos *in vitro* de origen humano. Los modelos hepáticos son los mejores candidatos habida cuenta de que el hígado es el órgano con mayor capacidad de metabolismo de fármacos. Entre ellos, los microsomas hepáticos son los que primero se emplearon, y en la actualidad continúan siendo ampliamente utilizados, no obstante, los modelos celulares son que ofrecen mejores perspectivas. El cultivo primario de hepatocitos humanos expresa la mayor parte de los enzimas implicados en el metabolismo de xenobióticos y se considera el modelo más próximo al hígado humano. Desafortunadamente, el acceso limitado a muestras de tejido hepático humano hace muy difícil su utilización en ensayos rutinarios. Como alter-

nativa, se han desarrollado líneas celulares que, mediante manipulación genética, expresan de forma individual cada uno de los enzimas P450. Estas células son una excelente herramienta para identificar los enzimas que participan en el metabolismo de un determinado compuesto, sin embargo, su principal inconveniente es que no son representativas del metabolismo hepático. En la actualidad, a través de diferentes aproximaciones experimentales, se persigue el objetivo de desarrollar líneas celulares estables que conserven la expresión del fenotipo típico del hepatocito adulto. La correcta aplicación de los ensayos *in vitro* permite anticipar el perfil metabólico del fármaco, la participación de enzimas polimórficos o la aparición de interacciones metabólicas debidas a fenómenos de inhibición o inducción enzimática.

2. INTRODUCCIÓN

Los fármacos, además de ejercer una acción farmacológica sobre un determinado tejido diana, sufren modificaciones químicas en su tránsito a través del organismo (absorción, distribución y excreción). Este proceso se denomina metabolismo o biotransformación de fármacos, y puede tener lugar en todos aquellos órganos o tejidos con los que el fármaco llega a estar en contacto. El proceso está catalizado por un grupo de enzimas denominadas genéricamente enzimas de fase 1, cuyo máximo representante es el citocromo P450 (P450), y enzimas de fase 2 o de conjugación (1). Aunque el intestino, pulmones, piel y riñón poseen cierta capacidad biotransformadora (2), es el hígado el órgano con mayor peso específico en el metabolismo de xenobióticos (3).

El metabolismo hepático de los fármacos es uno de los factores que más influyen en la biodisponibilidad, la variabilidad de la respuesta farmacológica y la toxicidad de los agentes terapéuticos, y comprenderlo es crucial para un mejor uso y desarrollo de nuevos medicamentos. La biotransformación es la etapa más variable y la que más influye en los niveles plasmáticos del fármaco tras su administración a varios individuos. La velocidad con la que un fármaco es biotransformado y el número y abundancia de los diversos metabolitos formados (*perfil metabólico*) puede variar considerablemente entre individuos. Esta circunstancia explica por qué para unos sujetos una determinada dosis de fármaco es terapéuticamente eficaz al generar niveles plasmáticos adecuados, mientras que para otros resulta ineficaz porque una metabolización más rápida no permita alcanzar la concentración plasmática terapéutica. La situación tiene mayor trascendencia en aquellos individuos en los que por carecer, o presentar un bajo nivel de expresión, de alguno de los enzimas implicados en el metabolis-

mo del fármaco se alcanzan niveles plasmáticos mucho más elevados de lo esperado tras una dosis que es bien tolerada por el resto de la población (4). Por todo ello, unas propiedades farmacocinéticas no satisfactorias pueden motivar el fracaso en el desarrollo de nuevos fármacos para el hombre (5) y son también una de las causas más frecuentes de incompatibilidad o interacción entre fármacos.

Tradicionalmente se han utilizado modelos animales tanto para el estudio de la farmacocinética como para detectar los posibles efectos tóxicos debidos a los fármacos, por el convencimiento de que las diferencias entre el animal de laboratorio y el hombre son fundamentalmente un problema de diferencia de escala en los parámetros farmacocinéticos. En base a ello, y teniendo en cuenta diferencias tales como peso corporal, tamaño del órgano y flujo sanguíneo, puede extrapolarse los resultados del animal al hombre. No obstante, si bien existen notables similitudes entre los animales y el ser humano en la absorción y distribución de los compuestos administrados, existen significativas diferencias en la biotransformación y posterior eliminación de los mismos. La razón estriba en que con frecuencia el patrón de enzimas que catalizan las reacciones de biotransformación (también denominadas de detoxificación) es distinto en los animales de laboratorio y el ser humano (6,7). La actividad de biotransformación, ni es escalable, ni necesariamente es similar, entre ellos. En consecuencia, la farmacocinética de un compuesto, en la medida que su metabolismo constituye una parte determinante de la misma, puede ser notablemente diferente, tanto por los metabolitos formados, como por la velocidad a la que se produce. Dichas diferencias explican además por qué pueden existir compuestos que, no siendo tóxicos para los animales, resultan serlo para el hombre. Así pues nos encontramos con que, en ocasiones, un modelo animal no es adecuado para el estudio del metabolismo humano, o que incluso ninguno de los modelos animales habitualmente utilizados, es adecuado para dicho estudio. Con demasiada frecuencia se ignora esta premisa, y los experimentos se siguen haciendo sistemáticamente en modelos animales. Sin embargo, ¿qué garantías se tienen a priori de que un determinado modelo animal será equivalente al ser humano? ¿Qué validez cabría dar a los resultados obtenidos con un compuesto en un modelo animal, si al administrarlo después a seres humanos se constata que su metabolismo es diferente?

Por todo ello, una tarea clave en las etapas iniciales del desarrollo de nuevos fármacos es la caracterización exhaustiva, no sólo de sus propiedades farmacológicas, sino también de su perfil metabólico en el hombre, de la velocidad y grado de metabolización, de los enzimas involucrados en su metabolismo,

así como de los posibles efectos inhibidores o inductores que el fármaco ejerce sobre los enzimas de biotransformación. Por razones de diversa índole interesa realizar estos estudios metabólicos en las etapas tempranas del desarrollo del fármaco. Asimismo, los ensayos se han de llevar a cabo en modelos experimentales que ofrezcan las máximas garantías para una correcta extrapolación de los resultados a la situación que tendrá lugar tras su administración con fines terapéuticos.

3. MODELOS HEPÁTICOS IN VITRO PARA ESTUDIOS DE METABOLISMO

En la medida en que el número de moléculas a analizar ha ido aumentando en los últimos años, ha surgido la urgente necesidad de disponer de herramientas experimentales que permitan un análisis rápido de sus propiedades metabólicas. Se trata de identificar y seleccionar, en el menor tiempo posible y con el mínimo coste, los mejores candidatos entre un gran número de compuestos diferentes. En definitiva, la finalidad de estos ensayos preliminares es reducir al máximo el número de candidatos que se consideran aptos para ser sometidos a un desarrollo posterior. En estas fases iniciales del desarrollo de nuevos fármacos es esencial disponer de una batería de ensayos experimentales que garantice una buena selección de los candidatos a nuevos fármacos. Aspectos básicos a tener en cuenta a la hora de seleccionar estos tests son el tiempo requerido para realizar los ensayos, el coste económico de los mismos y la fiabilidad de sus resultados.

Dado que los estudios de metabolismo que se realizan en animales no siempre son extrapolables al hombre, la propia industria farmacéutica es quién concede cada vez mayor importancia al hecho de conocer el metabolismo humano en etapas muy tempranas del desarrollo y quién mayor interés y esfuerzo está volcando en potenciar el uso y desarrollo de modelos experimentales *in vitro*, y muy particularmente aquellos de origen humano (8,9) (Figura 1). Los modelos hepáticos son, en principio, los mejores candidatos, habida cuenta de que el hígado es el órgano con mayor expresión de P450 y, por tanto, con mayor capacidad de metabolismo de fármacos. Entre ellos, los microsomas hepáticos son los que primero se emplearon y en la actualidad continúan siendo ampliamente utilizados. Los microsomas de hígado humano se pueden adquirir con facilidad a través de diferentes fuentes comerciales y, convenientemente conservados (-80°C), presentan niveles elevados de actividad de los diferentes P450s (10,11). Los microsomas preparados a partir de un *pool* de hígados (p.e. procedentes de al me-



Modelo	Ventajas	Limitaciones	Aplicaciones
Microsomas hepáticos 	<ul style="list-style-type: none"> • Disponibilidad ilimitada • Manejo sencillo • Estabilidad • Elevada capacidad metabólica 	<ul style="list-style-type: none"> • No enzimas citosólicos • Metabolismo incompleto • Incubaciones muy cortas • Alteración de membranas 	<ul style="list-style-type: none"> • Perfil metabólico • Estudios cinéticos • Estabilidad metabólica • Estudios de inhibición • Identificación de P450s implicados
Hepatocitos en cultivo 	<ul style="list-style-type: none"> • Buena correlación <i>in vitro - in vivo</i> • Metabolismo integrado • Membranas intactas • Respuesta a la inducción • Ensayos a largo plazo 	<ul style="list-style-type: none"> • Disponibilidad escasa • Exigencias técnicas • Inestabilidad fenotípica • Difícil interpretación de los datos cinéticos 	<ul style="list-style-type: none"> • Perfil metabólico • Estabilidad metabólica • Estudios de inhibición • Estudios de inducción • Interacciones a nivel del transporte

FIGURA 1. Características de los modelos *in vitro* más utilizados para estudios de metabolismo durante las fases preclínicas del desarrollo de nuevos fármacos.

nos 10 donantes diferentes) proporcionan un patrón de enzimas P450 que puede ser considerado, en principio, como representativo de la población general. No hay que olvidar que la expresión de P450, y en general de los enzimas de biotransformación de fármacos, puede variar en función de la edad, sexo o raza del sujeto, o de factores dietéticos, hormonales, patológicos, ambientales, etc. Alternativamente se pueden utilizar diferentes lotes de microsomas obtenidos a partir de hígados individuales, en cuyo caso se podría analizar la influencia de ciertos factores de especial interés (p.e. polimorfismos genéticos).

En los últimos años ha aumentado la convicción de que los modelos celulares son los candidatos que ofrecen mejores perspectivas. Es conocido que el metabolismo de los fármacos tiene lugar mayoritariamente en el hígado, dado que de entre todas las células del organismo los hepatocitos son los que poseen el mayor contenido en enzimas P450 y de conjugación. Los modelos celulares hepáticos utilizados para estudios de metabolismo corresponden fundamentalmente a tres grandes categorías: los cultivos primarios de hepatocitos, las líneas de células manipuladas genéticamente, que expresan un solo enzima de biotransformación y las líneas celulares derivadas de hepatomas o de hepatocitos inmortalizados (12-14).

Los hepatocitos humanos en cultivo primario constituyen, sin lugar a dudas, el modelo más próximo al hígado humano (15-20), ya que expresan de manera fiel la mayor parte de las actividades de metabolismo de xenobióticos que posee el hígado (16,19,20). Al tratarse de células intactas la integridad de las

membranas se conserva, lo que permite el estudio de interacciones a nivel del transporte de fármacos (p.e. glicoproteína P) (21). Además todos los enzimas de biotransformación, incluidos los citosólicos, permanecen coordinados y activos. En definitiva, los ensayos con hepatocitos proporcionan un entorno muy parecido al que el fármaco se pueda encontrar en el propio hígado, por lo que se considera el modelo *in vitro* que mejor reproduce el metabolismo *in vivo*. Hoy por hoy, los cultivos de hepatocitos son el único modelo celular hepático capaz de anticipar el metabolismo de una molécula dada y su potencial toxicidad en el ser humano, dado que producen un perfil metabólico muy similar al que se obtiene *in vivo* (22-24). Por tanto, es posible examinar qué metabolitos se forman, a qué velocidad lo hacen y a qué velocidad desaparecerá el compuesto de partida (24).

De la comparación de los datos obtenidos en ensayos con hepatocitos humanos y de animales, es posible determinar en qué modelo animal el metabolismo del fármaco es más parecido al que tendrá lugar el ser humano, o incluso constatar que no hay ningún modelo animal que reproduzca el metabolismo del ser humano. El hecho de analizar *in vitro* el metabolismo humano, es de vital importancia para ayudar a elegir la especie animal que se comporta de la forma más parecida al hombre frente a un compuesto determinado. Ello permite seleccionar la especie animal más adecuada para realizar los estudios de toxicidad y metabolismo, tanto *in vitro* como *in vivo*, en las etapas preclínicas y aumentar considerablemente la seguridad en la administración del fármaco en los estudios clínicos.

Desafortunadamente, el acceso a muestras de tejido hepático humano es tan limitado, que hace muy dificultosa su utilización para la evaluación rutinaria de nuevas moléculas. Como alternativa, en la última década se han desarrollado líneas celulares que, mediante manipulación genética, expresan de forma constitutiva e individual cada uno de los isoenzimas del P450. Para ello se han utilizado vectores de expresión que codifican por la secuencia completa de los genes de los diferentes P450 humanos (12-14, 25). Estas líneas celulares constituyen la herramienta más eficiente para identificar qué P450(s) participa(n) en el metabolismo de un determinado compuesto, y en la formación de cada uno de los metabolitos, así como en la proporción en que lo hacen. Es posible también predecir si en el metabolismo del fármaco participa algún enzima P450 polimórfico, aspecto éste de gran importancia en su posterior uso clínico (26,27). Estas células, aunque no hay duda de que aportan una información muy valiosa sobre aspectos clave del metabolismo hepático de los fármacos, poseen también ciertas limitaciones. La expresión del enzima P450 es artificial y con frecuen-

cia no reproduce el entorno del enzima nativo (p.e. integración en la membrana, coexpresión de la actividad NADPH-citocromo P450 oxidorreductasa o del citocromo b₅) (28,29). Por otro lado, debido a la expresión, con frecuencia excesiva, de un único enzima, estos modelos manipulados aportan información muy limitada sobre el metabolismo global del fármaco y no permiten anticipar el perfil metabólico completo de una nueva molécula en el hombre. No obstante, estas limitaciones no han supuesto un inconveniente para que el uso de los modelos recombinantes se haya extendido en los últimos años (28,30,31).

Un determinado compuesto puede actuar como inductor/ represor de los enzimas de biotransformación. El fenómeno de la inducción enzimática muestra, con frecuencia, una especificidad dependiente de la especie animal y, en consecuencia, es difícil identificar de forma segura en modelos animales las moléculas que puede ser inductores enzimáticos para el hombre. Los fármacos inductores modifican su propia farmacocinética, afectan su eficacia terapéutica o la de otros fármacos que se coadministren con él, y aumentan el riesgo de efectos adversos no deseados. Desde el punto de vista terapéutico, un fármaco inductor siempre presenta más dificultades en su manejo clínico. En la elección del candidato a fármaco, debe pues tenerse presente ese posible escenario. Por tanto, la inducibilidad de los enzimas hepáticos de biotransformación, y en particular de los P450s, por nuevos fármacos es otro aspecto clave a la hora de tomar decisiones. Su evaluación es muy difícil de predecir utilizando los modelos animales, pero en cambio, se puede investigar de forma muy precisa y fiable en cultivos de hepatocitos humanos permitiendo anticipar si el nuevo fármaco es inductor o no, así como qué enzimas P450 son inducidos (19,20). Por otra parte, es importante recordar que los fármacos rara vez se administran aislados, por lo que es posible que la presencia de un compuesto influya de manera determinante en el metabolismo del otro. Compuestos que comparten una misma ruta de biotransformación (por ejemplo son sustratos de un mismo P450), y lo hacen mayoritariamente a través de una sola ruta, son compuestos claramente candidatos a presentar fenómenos de interacción fármaco-fármaco.

En los últimos años se ha invertido un gran esfuerzo en desarrollar otros modelos celulares que puedan constituir una nueva alternativa a los hepatocitos humanos. A través de diferentes aproximaciones experimentales (líneas de hepatoma, células madre, etc) se persigue el objetivo de conseguir líneas celulares estables, capaces de proliferar en cultivo, pero conservando al mismo tiempo la expresión del fenotipo típico del hepatocito adulto (32-34). A pesar de que se han obtenido algunos resultados positivos, aún no se ha logrado alcanzar el nivel de éxito requerido (34,35). Todavía queda un largo camino por

recorrer en el que se están explorando nuevas estrategias para hacer que las líneas celulares de origen hepático recuperen la expresión de los genes específicos perdidos (36,37).

4. IDIOSINCRASIA METABÓLICA COMO CONSECUENCIA DE LA VARIABILIDAD GENO/FENOTÍPICA DE LOS ENZIMAS DE BIOTRANSFORMACIÓN

La biotransformación es posiblemente la etapa más variable y la que mejor explica las diferencias en los niveles plasmáticos tras la administración de la misma dosis de un compuesto a una población constituida por individuos considerados como “normales”. Es un hecho constatado que existe una significativa variabilidad en el metabolismo de fármacos y xenobióticos entre los individuos/grupos de población humanos (38). Dos razones contribuyen básicamente a la existencia de esas diferencias: la inducibilidad de los enzimas de biotransformación por xenobióticos, y la existencia de polimorfismos genéticos.

En efecto, agentes tales como fármacos, contaminantes ambientales, aditivos alimentarios, tabaco o alcohol actúan como inductores enzimáticos (39). Una definición “clásica” de inducción implica síntesis *de novo* del enzima como resultado del aumento de la transcripción del correspondiente gen, en respuesta a un estímulo apropiado. Sin embargo, en los estudios sobre el metabolismo de xenobióticos el término inducción se utiliza frecuentemente en un sentido más amplio para describir un aumento en la cantidad y/o actividad del enzima como resultado de la acción de agentes químicos, independientemente del mecanismo por el que se haya producido (por ejemplo, aumento de la transcripción, estabilización del mRNA, aumento de la traducción o estabilización del enzima) (40). Si bien la mayor parte de los estudios de inducción se restringen a los efectos sobre los P450s, el fenómeno de inducción no es exclusivo de estos enzimas y afecta también a enzimas de conjugación.

No todas estas diferencias en la actividad de biotransformación se pueden atribuir a la acción de inductores. Parte de dicha variabilidad es debida a la existencia de genes polimórficos que se heredan mendelianamente, y que codifican por enzimas con una eficacia metabólica diferente frente a sus substratos (41). Diferentes isoenzimas del P450 (CYP1A1/2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1) y enzimas de conjugación (N-acetiltransferasa y glutathion S-transferasa) se expresan de forma polimórfica (42,43). El polimorfismo tiene su origen en la existencia

de cambios genéticos como consecuencia de mutaciones, delecciones y/o amplificaciones. Típicamente se presentan dos tipos de situaciones (4): (i) sujetos con genes defectivos (mutado, incompleto, inexistente, etc.) que como consecuencia de ello metabolizan peor el fármaco (metabolizadores lentos); y (ii) individuos con genes funcionales duplicados o amplificados que como consecuencia de ello tienen una mayor capacidad de metabolización (metabolizadores ultrarrápidos). Los polimorfismos mejor estudiados son los de la debrisoquina/esparteína hidroxilasa (CYP2D6) (44-46), y el de la S-mefenitoína hidroxilasa (CYP2C19) (47-49) que afectan a más del 7% y del 5% de la población caucásica respectivamente, y que pueden dar lugar a alteraciones significativas en la metabolización de más de 30 fármacos de uso común. El polimorfismo genético del P450, junto con la variabilidad fenotípica, es la causa más frecuente en las diferencias interindividuales en la metabolización de fármacos.

5. RELEVANCIA CLÍNICA DE LA VARIABILIDAD E IDIOSINCRASIA METABÓLICAS

El metabolismo de fármacos por los enzimas hepáticos hay que entenderlo como un conjunto de reacciones en las que distintos enzimas compiten por un mismo sustrato: el fármaco. De la afinidad del fármaco por cada enzima (K_M), y de las características cinéticas de la reacción catalizada (V_{MAX}) dependerá la importancia de esa reacción en el contexto global de la metabolización del fármaco. Por tanto, pueden darse dos situaciones extremas: a) que el compuesto sea sustrato de varios enzimas, pero originando básicamente un mismo metabolito, o b) que varios enzimas estén implicados en su metabolismo resultando en la formación de diferentes metabolitos.

En el primero de los casos, la variabilidad en el patrón de expresión de los enzimas implicados en el metabolismo de un fármaco se traduce en diferencias en su velocidad de metabolización y, con ello, en su farmacocinética. Este fenómeno puede tener como consecuencia tanto una metabolización deficiente de fármacos, con la consiguiente acumulación del compuesto en el organismo, niveles plasmáticos anormalmente elevados, como, en el otro extremo, una metabolización tan acelerada que impida alcanzar niveles terapéuticos adecuados y el efecto farmacológico deseado.

En el segundo caso, las variaciones se observarían en el perfil metabólico del fármaco, es decir, la cantidad y proporción relativa de los metabolitos formados serían claramente diferentes. Esto puede traducirse en una menor efica-

cia farmacológica si el metabolito, y no el compuesto administrado, es el farmacológicamente activo, o bien, en la producción en cantidad anormal de un metabolito más tóxico, responsable de efectos adversos.

La variabilidad geno-fenotípica de los P450, además de ser responsable directa de las diferencias farmacocinéticas (biodisponibilidad, vida media, velocidad y grado de metabolización, perfil metabólico) e indirectamente de las farmacodinámicas (ineficacia terapéutica/respuesta exagerada, efectos no deseados) (41,43), está en la raíz de la toxicidad idiosincrásica (50). Este tipo de reacciones adversas, minoritario en gran parte de la población, puede tener un peso específico considerable en aquellos otros individuos con niveles singulares de expresión de los distintos P450s (51). En ocasiones, si el enzima implicado en la producción de un metabolito no tóxico está poco expresado en un determinado individuo, el metabolismo del fármaco en dicho sujeto sigue otras vías que dan origen a metabolitos mucho más tóxicos y que son minoritarios en el perfil metabólico observado en el resto de los individuos. En otros casos puede ser la existencia anormalmente elevada de un determinado enzima, minoritario en los demás individuos, que conlleva la producción de un metabolito más tóxico. Estas diferencias (idiosincrasia metabólica) son un factor de riesgo sobreañadido a la difícil aventura de conseguir que una nueva molécula llegue a término como nuevo medicamento. La razón es simple: compuestos que no han demostrado efectos adversos en los primeros ensayos clínicos, al extender su uso a una mayor población, y con ello dar posible entrada a individuos con singularidades metabólicas, pueden aparecer fenómenos de toxicidad idiosincrásica capaces de llevar al fracaso económico dicho desarrollo.

Disponer de sistemas *in vitro* capaces de reproducir fielmente el metabolismo *in vivo* de los fármacos es uno de los objetivos perseguidos por distintos grupos de investigación. Es harto conocido el uso de cultivo de hepatocitos humanos en estudios de farmacotoxicología (14,52,53). Sin embargo, en estos modelos solo es posible influir sobre la expresión de los enzimas de biotransformación de una manera limitada. Por ejemplo, mediante el uso de inductores enzimáticos es posible aumentar los niveles de expresión de los P450s (22,23,54). Pero, aun utilizando inductores específicos tales como metilcolantreno, fenobarbital o rifampicina no es posible modificar de manera selectiva uno de ellos sin influir sobre los otros (20).

Otra posible alternativa es la utilización de líneas celulares manipuladas genéticamente para sobreexpresar uno de los P450s humanos (14). Estas líneas son un instrumento útil para determinar si un enzima particular está implicado en la formación de un determinado compuesto. Sin embargo, no son una alternativa

válida para averiguar en qué medida diferencias en la expresión de uno de los enzimas influye en el perfil metabólico y la velocidad de metabolización del fármaco por los hepatocitos.

El modelo ideal sería aquel que permitiese modular de manera sencilla la expresión individualizada de un enzima sin influir en los otros (58). En el caso de la inducción, existen distintas estrategias experimentales que podrían ser aplicables, basadas en la utilización de vectores de expresión con un promotor activable por un determinado compuesto exógeno de una forma concentración-dependiente. De esta manera, en función de la concentración del activador, se produce una mayor o menor expresión del gen heterólogo clonado “en fase” a continuación del promotor. Entre los diferentes sistemas empleados cabe destacar: a) el sistema basado en el operón Tn10a (*Tet-on* y *Tet-off*) (55-57) que requiere una doble transfección estable de las células; b) el sistema GRE-ecdysona (59): este sistema también requiere una doble transfección estable de las células; y c) sistemas basados en el promotor de la metalotioneína que presenta capacidad para regular la expresión del gen situado “en fase” en función de las dosis de Zn^{2+} y otros metales pesados (60).

Los problemas asociados con el uso de estos vectores de expresión son varios. En primer lugar, no son estrictamente dosis dependiente y, con frecuencia, se comportan como “todo-o-nada”, o bien no son totalmente bloqueables. El resultado de ello es que, actualmente, se carece de modelos celulares eficaces capaces de reproducir *in vitro* la variabilidad humana en el metabolismo de los fármacos.

6. INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS Y METABOLISMO HEPÁTICO

Las interacciones medicamentosas se deben a cambios que se producen en los efectos de un fármaco como consecuencia de la ingestión simultánea de otro fármaco (interacciones fármaco-fármaco) o de los alimentos consumidos (interacciones fármaco-alimento). Esta interacción puede ocurrir a nivel farmacodinámico, al interferir un fármaco con la acción farmacológica del otro, o a nivel farmacocinético, al alterar la velocidad de absorción, metabolismo o excreción de otro fármaco. De forma particular, se habla de una interacción metabólica cuando el metabolismo de un fármaco es alterado por la presencia de otro (61). Ya hemos señalado que el P450 es el principal artífice del metabolismo de fármacos, por lo que en la mayor parte de las interacciones está involucrado este

sistema enzimático. De todos los enzimas P450 identificados hasta el momento en el hombre, seis de ellos, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4, son los que tienen una mayor participación en el metabolismo de fármacos. En particular, el CYP3A4 es el más abundante en el hígado humano y se considera responsable de la transformación de cerca del 50% de las moléculas con aplicaciones terapéuticas (62,63).

Cuando se administran dos o más fármacos que son metabolizados por un mismo P450, se puede producir una competencia entre los mismos por su unión al enzima, que puede conducir a que el metabolismo de al menos uno de los fármacos resulte seriamente disminuido. Además, muchos fármacos actúan como potentes inhibidores competitivos de un determinado P450, aunque ese enzima no participe directamente en su metabolismo. Se ha descrito también la acción de moléculas capaces de producir inhibición no competitiva mediante su unión al complejo sustrato-enzima o al grupo hemo del P450 (64-66). En general se trata de metabolitos que forman un complejo estable e inactivo con el enzima. Esta inactivación funcional del enzima puede ser reversible. El tercer tipo de inhibidores del P450 lo constituyen aquellos compuestos que tras ser oxidados por el P450 forman un intermediario reactivo que se une irreversiblemente al enzima bloqueando su actividad, son los conocidos como sustratos suicidas (67,68). La principal consecuencia de una acción inhibidora sobre el P450 es la disminución de la velocidad de metabolización del fármaco y, en definitiva, la aparición de niveles sistémicos del fármaco aumentados que pueden provocar una respuesta terapéutica exagerada o la aparición de efectos adversos o toxicidad (40). No hay que olvidar que la administración simultánea de varios fármacos es una práctica terapéutica muy frecuente. Además, no hay que descartar el posible papel de otros xenobióticos (componentes de la dieta, agentes ambientales, alcohol, etc) con efectos inhibidores o inductores del P450, en la alteración del metabolismo de fármacos.

Otra posible causa de interacciones metabólicas es la inducción de enzimas P450 por determinados fármacos. Con excepción del CYP2D6, los otros cinco enzimas P450 considerados como principales responsables del metabolismo de fármacos son inducibles (39,69). Las interacciones que se producen a través de un mecanismo de inducción son mucho menos frecuentes que las debidas a fenómenos de inhibición, pero no por ello deben ser obviadas. La administración repetida de un fármaco con capacidad de inducción de uno o varios enzimas P450 puede acelerar su propio metabolismo o el de otros fármacos y, como consecuencia, alterar su acción terapéutica (70). Si la molécula farmacológicamente activa es el compuesto original se observará una disminución de su eficacia

terapéutica, pero si la forma activa es el metabolito la respuesta será menor. En ambos casos, sería recomendable conocer el riesgo de aparición de tales efectos de forma previa a su administración. La predicción del potencial inductor de un fármaco en desarrollo presenta grandes dificultades. Con frecuencia se recurre a modelos experimentales con animales, que no siempre son predictivos para el hombre. En general los inductores de los enzimas CYP1A muestran efectos similares en todas las especies. Sin embargo, para otros compuestos se han encontrado diferencias significativas. La rifampicina, por ejemplo, es un potente inductor en el hombre y otras especies, pero no en la rata (71); por el contrario, la pregnenolona 16 α -carbonitrilo es un potente inductor del CYP3A en la rata, pero no en el hombre (72). Estas sensibles diferencias cuestionan la utilidad de los modelos animales y apuntan hacia la necesidad de estudiar el fenómeno de la inducción directamente en modelos humanos. Por razones obvias, los estudios en el hombre se limitan a los fármacos en desarrollo que se encuentran en las fases clínicas y no a candidatos en estadios preclínicos.

7. IDENTIFICACIÓN DE INTERACCIONES METABÓLICAS POR INHIBICIÓN DE ENZIMAS P450

La mayor parte de los fármacos son metabolizados a través de oxidaciones catalizadas por el P450, por lo que no es de extrañar que las interacciones metabólicas ocurran mayoritariamente a nivel de este sistema enzimático. Resulta, por tanto, evidente que el modelo biológico ideal para el estudio *in vitro* de posibles interacciones metabólicas será aquel que mejor reproduzca la expresión *in vivo* de los enzimas P450. Los ensayos de inhibición clásicos están basados en el uso de microsomas hepáticos y aún hoy en día son de los más utilizados. La popularidad de este modelo se fundamenta en su gran capacidad metabólica y en que resulta más accesible que otros modelos (p.e. hepatocitos humanos) (10). Los ensayos con microsomas son sencillos y permiten realizar medidas cinéticas de actividades P450 en ausencia de otros procesos metabólicos o de transporte. Sin embargo, en algunas circunstancias esta notable simplicidad constituye su principal desventaja. Los microsomas sólo pueden ofrecer una visión parcial del metabolismo *in vivo* del fármaco (p.e. no todos los enzimas de conjugación están presentes) y la ausencia de compartimentos celulares impide evaluar la posible interferencia sobre los fenómenos de transporte. Ya hemos comentado que los ensayos con hepatocitos constituyen una seria alternativa, al cubrir ampliamente las limitaciones inherentes al uso de modelos no celulares (21,22,73). Sin embargo, la mayor complejidad del modelo dificulta la inter-

pretación de los resultados y enlentece el desarrollo de los ensayos, por lo que con frecuencia en los estudios preliminares se opta por modelos que, como los microsomas, resultan más manejables.

Si bien las autoridades reguladoras estiman necesario identificar durante el desarrollo de nuevos fármacos la posible aparición de interacciones metabólicas, no han establecido, hasta el momento, los ensayos *in vitro* e *in vivo* que han de realizarse con este fin. En este sentido, sería deseable una armonización de los ensayos a utilizar que permitiera garantizar la adecuación de los estudios llevados a cabo y facilitara la comparación entre diferentes fármacos (74). El sistema biológico a utilizar, el parámetro a determinar, la concentración del fármaco a estudiar, las condiciones experimentales o los criterios de interpretación de los resultados son aspectos claves que requieren una precisa estandarización.

Todos los ensayos cuyo objetivo es la identificación del potencial inhibitorio de los fármacos sobre los P450 están basados en la medida de la actividad de dichas enzimas. La adecuada elección del sustrato es una de las cuestiones claves a la hora de diseñar los ensayos (75). La selección definitiva se establece en base a un compromiso entre selectividad, sensibilidad y disponibilidad del compuesto. Por un lado el sustrato ha de ser cuidadosamente elegido para que proporcione información selectiva sobre el enzima deseado. Cada enzima P450 es capaz de oxidar un número elevado de xenobióticos y, al mismo tiempo, un xenobiótico puede ser sustrato de diferentes P450s. En general los xenobióticos tienden a ser biotransformados por varios P450s y son pocos los metabolizados por un único enzima (66). Este solapamiento funcional limita el abanico de moléculas que pueden utilizarse como sustratos selectivos para un P450 en particular. En la actualidad se dispone de una batería de moléculas que pueden ser utilizadas para la medida selectiva de la actividad de los principales enzimas P450 implicados en el metabolismo de fármacos, incluso en modelos que expresan todos los P450s (p.e. microsomas hepáticos, hepatocitos) (66,75-77). Se trata de ensayos que en su mayoría requieren el uso de técnicas de HPLC como paso previo a la cuantificación del metabolito, lo que indudablemente dificulta su aplicación en ensayos a gran escala en los que se trata de identificar y comparar el potencial inductor de un número elevado de compuestos.

Más recientemente se han descrito métodos que no necesitan una separación previa de los metabolitos. Se basan en la utilización de sustratos no fluorescentes, o con baja fluorescencia, que tras su transformación por el P450 se convierten en moléculas altamente fluorescentes en solución acuosa. Los ensayos fluorimétricos son rápidos y muy sensibles. La actividad se puede medir

TABLA 1. *Substratos para la medida de actividades P450 por fluorescencia*

<i>CYP</i>	<i>Substrato</i>	<i>Metabolito</i>	<i>Observaciones</i>
1A2	CEC	CHC	
	BFC	HFC	
	7-Etoxiresorufina	Resorufina	Selectivo
	7-Metoxiresorufina	Resorufina	Selectivo
2A6	Cumarina	7-Hidroxycumarina	Selectivo
2B6	EFC	HFC	
	Benzoxiresorufina	Resorufina	
	BFC	HFC	
2C8	Dibencilfluoresceína	Fluoresceína	
2C9	Dibencilfluoresceína	Fluoresceína	
	MFC	HFC	
2C19	Dibencilfluoresceína	Fluoresceína	
	3-O-Metilfluoresceína	Fluoresceína	
	CEC	CHC	
	BFC	HFC	
2D6	EFC	HFC	
	AMMC	AHMC	Selectivo
	MAMC	HAMC	Selectivo
	CEC	CHC	
2E1	MFC	HFC	
	EFC	HFC	
	7-Etoxicumarina	7-Hidroxycumarina	
3A4	7-Benciloxiquinolina	Quinolinol	
	BFC	HFC	
	DFB	DHB	Selectivo
	Benzoxiresorufina	Resorufina	
	Dibencilfluoresceína	Fluoresceína	
	BFBFC	HFC	Selectivo

CEC: 3-Ciano-7-etoxicumarina; CHC: 3-Ciano-7-hidroxycumarina; BFC: 7-benciloxi-4-trifluorometilcumarina; HFC: 7-hidroxi-4-trifluorometilcumarina; EFC: 7-Etoxi-4-trifluorometilcumarina; MFC: 7-metoxi-4-trifluorometilcumarina; AMMC: 3-(2-(N,N-dietil-N-metilamino)etil(-7-metoxi-4-metilcumarina; AHMC: 3-(2-(N,N-dietil-N-metilamino)etil(-7-hidroxi-4-metilcumarina; MAMC: 7-metoxi-4-(aminometil)-cumarina; HAMC: 7-hidroxi-4-(aminometil)-cumarina; DFB: (3,4-difluorobenziloxi)-5,5-dimetil-4-(4-metilsufonilfenil)-(5H)-furan-2-ona; DHB: 3-hidroxi-5,5-dimetil-4-(4-metilsufonilfenil)-(5H)-furan-2-ona; BFBFC: 2,5-bis(trifluorometil)-7-benciloxi-4-trifluorometilcumarina.

con muy poca cantidad de material biológico y los ensayos de inhibición se pueden realizar en placas con formato de 96-pocillos (73,76,78-81). Los substratos poco solubles en agua, con fluorescencia basal relativamente alta, con baja tasa de transformación en el metabolito fluorescente, con una relación señal/ruido baja o que requieren una longitud de onda de excitación en el rango ultravioleta no son apropiados para estos ensayos. Derivados O-alkilados de la resoru-

fina (82), fluoresceína (83), 7-hidroxycumarina (84-86,89), 6-hidroxiquinolina (83) y 4-metilsulfonilfenil furanona (90) han sido propuestos para estos ensayos (Tabla 1). El principal inconveniente es que sólo unos pocos sustratos fluorogénicos son selectivos para un P450 en particular (89-93). La mayoría son metabolizados por varios P450 y, por tanto, no son adecuados para ensayos en los que están presentes más de un P450 (p.e. microsomas hepáticos, hepatocitos). Sin embargo, resultan de gran utilidad en los estudios con los modelos recombinantes que expresan un único P450 (79,81,94).

Un ensayo de inhibición se basa en la medida de una actividad P450 en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor. Dado que los estudios de inhibición pueden realizarse usando diferentes sistemas biológicos (microsomas hepáticos, modelos recombinantes, hepatocitos) las condiciones de ensayo deben ser cuidadosamente optimizadas para el modelo experimental a utilizar en cada caso. La duración del ensayo debe garantizar la linealidad de la formación de metabolito y depende en gran medida del sustrato y del modelo experimental utilizado (74). Salvo excepciones, el tiempo de los ensayos en microsomas no debe superar los 30 minutos. Por el contrario, en los ensayos con sistemas celulares la reacción se comporta de forma lineal durante al menos una hora y con frecuencia es recomendable utilizar tiempos de incubación incluso más largos (76). En algunos casos la inhibición sobre el P450 es dependiente del tiempo de contacto entre el inhibidor y el enzima. Si el inhibidor es activamente metabolizado por cualquiera de los enzimas P450 presentes durante el ensayo su concentración se verá sensiblemente disminuida durante el ensayo, por lo que capacidad inhibidora será menor. En concreto, la inhibición irreversible del P450 por formación de metabolitos reactivos también se ve afectada notablemente por la duración del ensayo (95). Esta inhibición dependiente del tiempo se puede examinar a través de diferentes aproximaciones experimentales. Una forma de abordar el estudio es examinar la inhibición producida tras diferentes tiempos de incubación (95). En teoría el valor del IC_{50} de un inhibidor reversible que sigue una cinética de Michaelis-Menten no cambia significativamente con el tiempo de incubación. Una disminución del valor IC_{50} del fármaco en función del tiempo de ensayo sugiere que se trata de un *inhibidor irreversible*, mientras que el aumento del IC_{50} puede deberse a una disminución significativa de la concentración del compuesto por su degradación metabólica o su unión a proteínas (Figura 2) (95). Otra posibilidad es comparar los valores de IC_{50} obtenidos en ensayos en los que el inhibidor y el sustrato se adicionan simultáneamente o en aquellos ensayos en los que se realiza una preincubación con el inhibidor antes de añadir el sustrato (Figura 3) (94,96). Un mismo valor IC_{50} para ambos casos es indicativo de que el inhibidor no es metabolizado durante el ensayo. Por el contrario, si el compuesto inductor

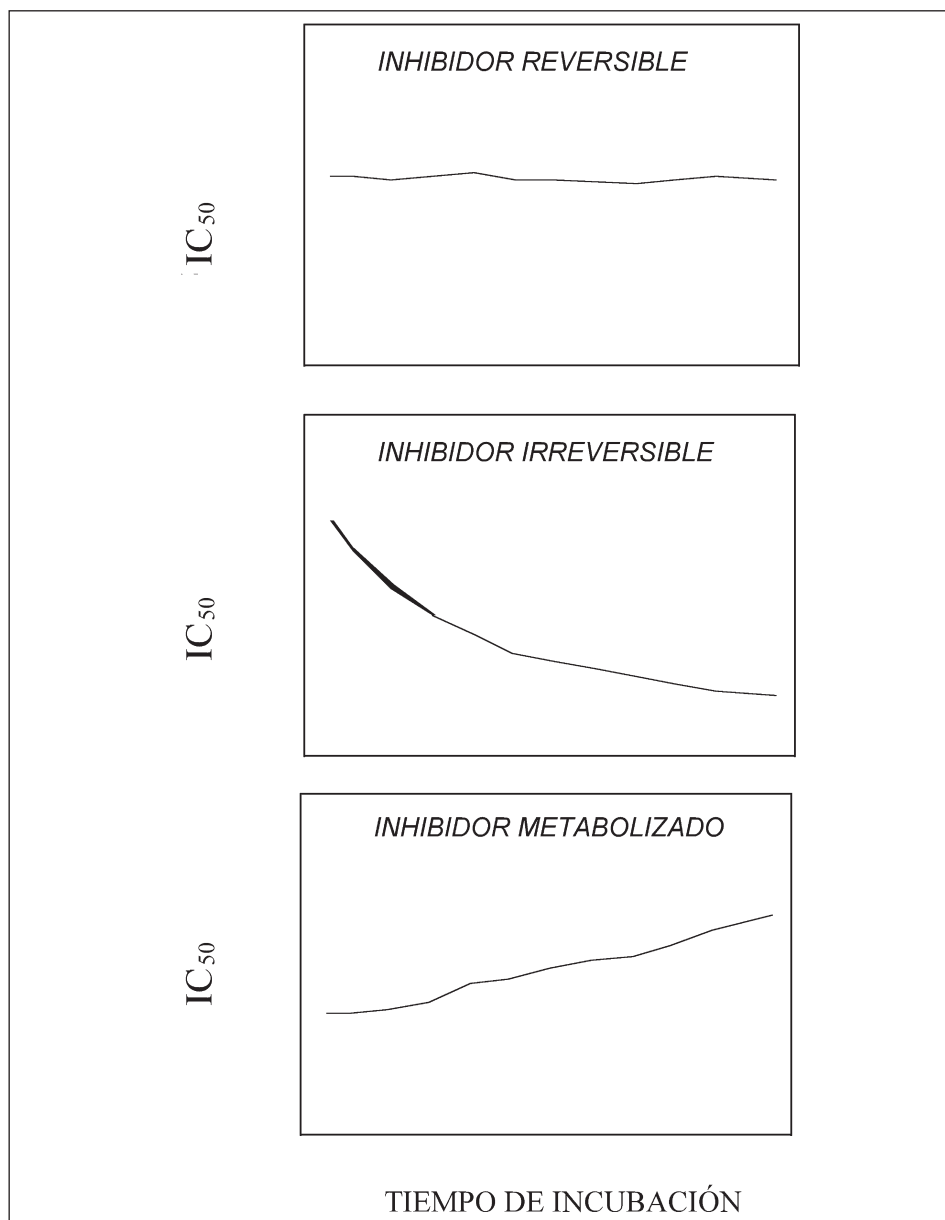


FIGURA 2. Dependencia del valor de IC_{50} en función del tiempo de incubación para diferentes tipos de inhibidores. (A) Si el compuesto estudiado actúa como un inhibidor reversible, el valor de IC_{50} no varía durante el ensayo. (B) Para inhibidores irreversibles el IC_{50} disminuye en función del tiempo de incubación. (C) El aumento del valor del IC_{50} sugiere que la concentración del compuesto disminuye durante el ensayo debido a su metabolismo o a su unión a proteínas.

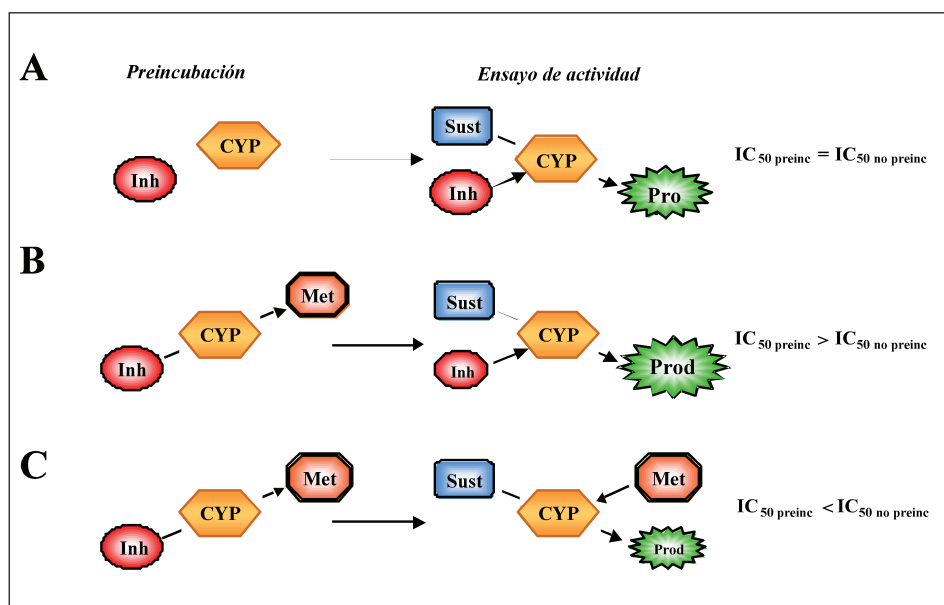


FIGURA 3. Esquema para identificar inhibidores metabolizados por los enzimas P450. (A) Si el inhibidor no es metabolizado durante el ensayo de inhibición los valores de IC_{50} obtenidos en ensayos con y sin preincubación son iguales. (B) Si el inhibidor es metabolizado durante el ensayo su concentración se verá disminuida y el valor de IC_{50} obtenido en el ensayo con preincubación será mayor. (C) Si el efecto inhibitorio es debido a un metabolito generado durante el ensayo, el valor IC_{50} correspondiente al ensayo con preincubación será menor.

es activamente metabolizado, su concentración disminuirá sensiblemente durante la preincubación y el efecto inductor observado será menor (mayor IC_{50}) que en el ensayo sin preincubación (94,96). Por último, un mayor efecto inductor (menor IC_{50}) en el ensayo con preincubación indica que probablemente la inhibición no es debida a la molécula original, sino que es consecuencia de su activación a un metabolito con capacidad de interaccionar con el P450. A modo de ejemplo la Figura 4 muestra el diferente comportamiento de la furafilina (un inhibidor irreversible del CYP1A2 por formación de un intermediario reactivo que se une al enzima) y del sulfafenazol (inhibidor competitivo del CYP2C9) en función de si el ensayo se realiza con o sin preincubación. Cuando el ensayo de inhibición del CYP1A2 se realiza en hepatocitos que han sido previamente incubados con furafilina se observa un desplazamiento de la curva de inhibición hacia la izquierda (concentraciones menores del inhibidor), con respecto al ensayo sin preincubación, mientras que en la inhibición del CYP2C9 con sulfafenazol no se observan estas diferencias (20).

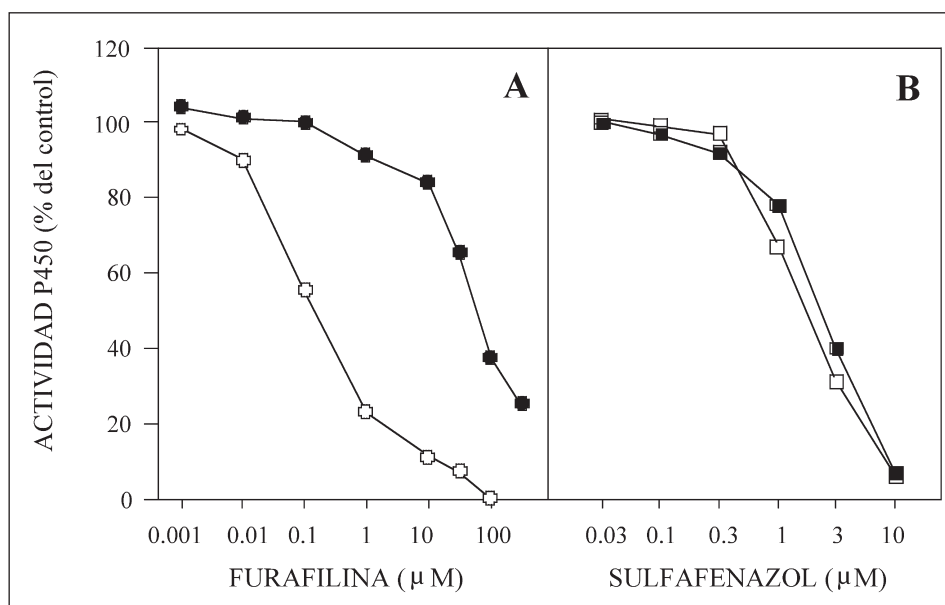


FIGURA 4. Efecto de la preincubación sobre la inhibición producida por furafilina y sulfafenazol en hepatocitos humanos en cultivo primario. Los ensayos de inhibición de actividades P450 se realizaron por incubación de los hepatocitos con el sustrato adecuado y concentraciones crecientes del inhibidor. Antes de realizar los ensayos de actividad las células fueron preincubadas (o) o no (●) con el inhibidor. (A) Inhibición de la actividad CYP1A2 por furafilina y (B) inhibición de la actividad CYP2C9 por sulfafenazol.

La relevancia de los estudios de inhibición depende en gran medida de la elección del modelo biológico. Ya se ha comentado que son varias las alternativas experimentales que se manejan (microsomas hepáticos, modelos celulares, sistemas de expresión heteróloga de un único enzima P450, sistemas multienzimáticos). Lo importante es conocer de antemano las diferentes posibilidades antes de tomar una decisión definitiva. Un modelo ideal sería aquel que permitiera identificar de forma rápida, sencilla e inequívoca la posible capacidad inhibitoria de las moléculas en desarrollo sobre cada uno de los P450 de interés. Los sistemas que expresan un único P450 son, en principio, la mejor opción. No obstante, estos modelos no permiten la detección de efectos inhibitorios producidos por un metabolito generado por una reacción catalizada por otro enzima diferente (94,97). Ante esta situación, una opción muy práctica es la comparación de la información obtenida a través de dos modelos experimentales de características diferentes: uno que exprese exclusivamente el P450 a estudiar y otro que exprese de forma completa el patrón de enzimas propio del hígado hu-

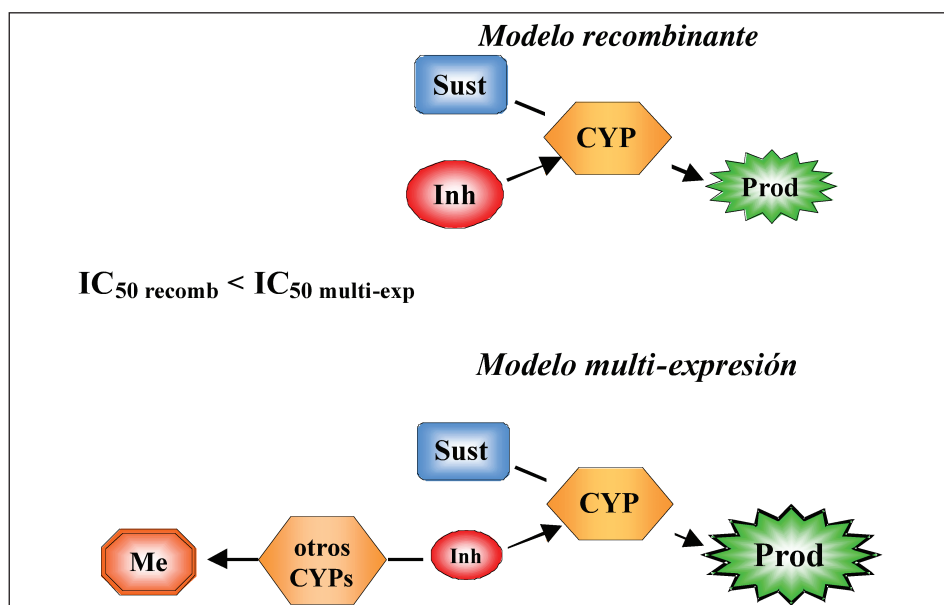


FIGURA 5. Comparación de los posibles patrones de inhibición en modelos recombinantes que expresan un único enzima P450 o en modelos multi-expresión. Si tras realizar el mismo ensayo de inhibición en un modelo recombinante que sólo expresa el enzima P450 de interés y en un modelo que expresa varios enzimas P450 se obtiene un menor valor IC_{50} en el modelo recombinante, el resultado sugiere que el inhibidor es metabolizado por otro(s) enzima(s) diferente(s) al enzima P450 cuya inhibición se está estudiando.

mano (76,94). Si la molécula cuyo potencial inhibidor se está examinando es activamente metabolizada por otros enzimas diferentes del P450 de interés, su concentración disminuirá sensiblemente en los modelos que expresan varios enzimas (modelo multi-expresión, p.e. hepatocitos), por lo que el efecto inhibidor observado será menor (mayor IC_{50}) que en un modelo que sólo expresa el enzima P450 cuya inhibición se quiere estudiar (Figura 5).

8. IDENTIFICACIÓN DE INTERACCIONES METABÓLICAS POR FENÓMENOS DE INDUCCIÓN

Durante los ensayos clínicos, o los realizados *in vivo* con animales de experimentación, puede sospecharse una acción inductora del fármaco en estudio cuando se observan cambios en ciertos parámetros cinéticos como, por ejemplo, una disminución del área bajo la curva tras sucesivas administraciones. No obs-

tante, es difícil identificar la inducción producida sobre enzimas P450 que no participan directamente en el metabolismo del propio fármaco y cuyos efectos se observarían sobre el metabolismo de otros fármacos. En la actualidad se recurre a la utilización de modelos humanos *in vitro* que, en combinación con los datos clínicos, permiten la identificación de las propiedades inductoras de los nuevos fármacos.

Los estudios de inducción requieren el uso de modelos celulares con capacidad de transcripción y traducción de genes de enzimas P450, con lo que quedan descartados los microsomas. Los hepatocitos humanos en cultivo son el modelo mejor aceptado en la actualidad para evaluar el potencial inductor de un compuesto (19,74). Los sistemas basados en la obtención de secciones muy finas de tejido hepático (*liver slices*) también han sido utilizados para ensayos de inducción, aunque los resultados obtenidos con este modelo aún no han sido suficientemente contrastados (74,98). Los ensayos de inducción con hepatocitos en cultivo o con *slices* requieren una cantidad elevada de material biológico y no permiten el estudio de muchos compuestos en un mismo experimento. La escasa disponibilidad de tejido hepático fresco para su preparación es, sin duda, la principal limitación a la hora de aplicar estos modelos humanos *in vitro* al estudio de gran número de moléculas. Es por ello que los ensayos de inducción no pueden aplicarse en las fases iniciales del desarrollo de fármacos, en las que el número de moléculas que se maneja es considerable, y se limitan a los candidatos seleccionados en etapas posteriores.

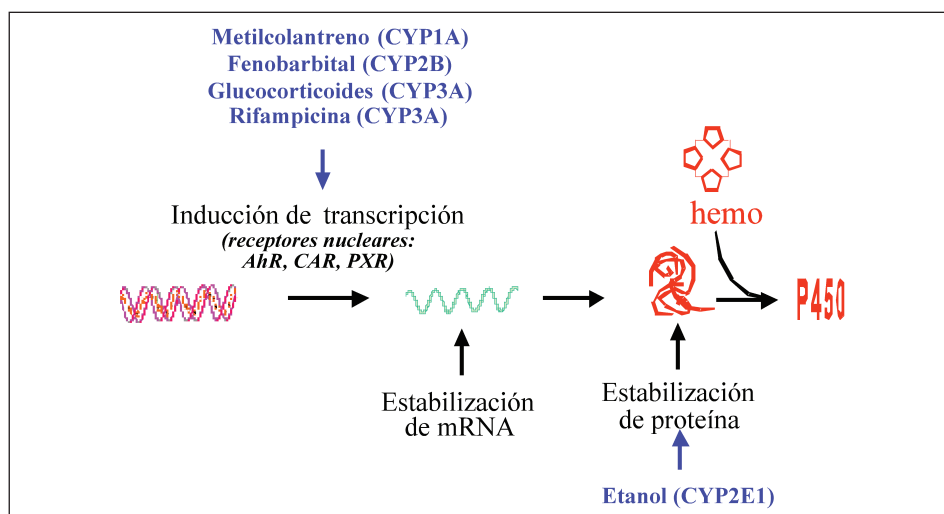
Un protocolo típico de inducción consiste en el tratamiento de las células durante un período de entre 24 horas (para estudios de mRNA) y 72 horas (para los estudios basados en medida de actividades o niveles de proteínas) con una o, preferiblemente, varias concentraciones del compuesto a estudiar. Con frecuencia se observa una gran variabilidad en la respuesta a la inducción de diferentes preparaciones de hepatocitos (99,100). Las características del donante (genética, tratamiento con fármacos, consumo de tabaco o alcohol, hábitos alimenticios, etc) a partir del cual se ha obtenido el tejido hepático y la calidad de las células son los principales responsables de estas diferencias. Para comparar los datos obtenidos a partir de diferentes preparaciones, en cada experimento se incluyen controles positivos de inducción. En la tabla 2 se indican algunos de los inductores modelo más utilizados. A modo de orientación, se considera que la molécula estudiada produce un efecto inductor si la respuesta observada es de al menos el 40% del nivel de inducción alcanzado por el control positivo.

La cuantificación de cambios en las actividades enzimáticas ha sido el procedimiento utilizado de forma clásica para el estudio de la inducción y, proba-

TABLA 2. *Controles positivos de inducción in vitro de enzimas P450 humanos*

CYP	Inductor	Concentración (μM)
1A2	3-Metilcolantreno	2
	β-Naftoflavona	10-50
	Omeprazol	25-50
2A6	Rifampicina	10-50
2B6	Fenobarbital	500-1000
	Rifampicina	10-50
2C9	Rifampicina	10-50
	Dexametasona	10-50
3A4	Rifampicina	10-50
	Dexametasona	10-50

blemente, es el método de elección. Estos ensayos metabólicos se realizan incubando las células con sustratos que permiten identificar la actividad de un P450 en particular (22,23,101). Los análisis por *Western blot* sólo permiten identificar cambios groseros en los niveles de la correspondiente proteína y son, en general, menos cuantitativos. Estos ensayos a nivel de proteína son particular-

FIGURA 6. *Mecanismos de inducción de las enzimas P450.*

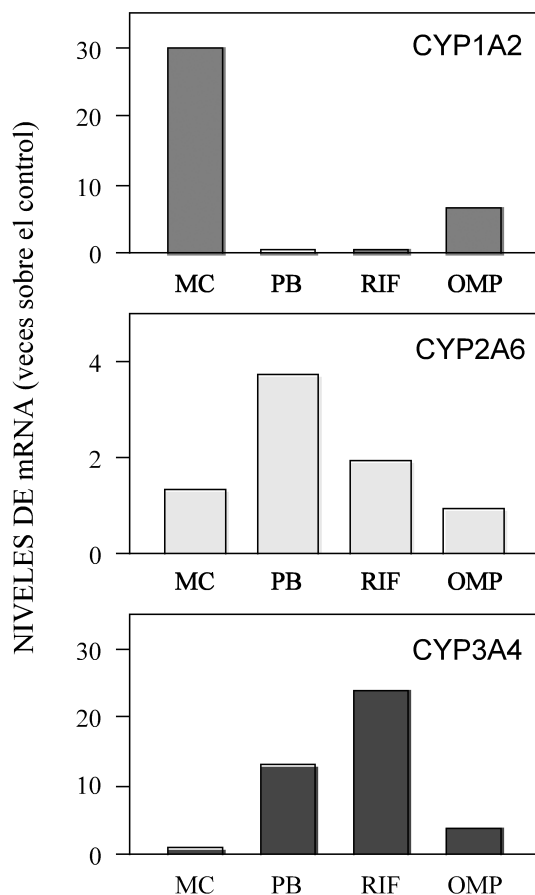


FIGURA 7. Efecto de inductores modelos sobre los niveles de mRNA de enzimas P450. Tras tratar los hepatocitos humanos en cultivo con metilcolantreno (MC) 2 μ M, fenobarbital (PB) 500 μ M, rifampicina (RIF) 50 μ M u omeprazol (OMP) 50 M durante 48 horas, se evaluó por RT-PCR el contenido en mRNA correspondiente a CYP1A2, CYP2A6 o CYP3A4.

mente útiles para detectar la inducción producida por compuestos que actúan simultáneamente como inductores e inhibidores de los P450s, lo cual es muy difícil de determinar a través de medidas enzimáticas (98). Del mismo modo, los cambios en los niveles de mRNAs pueden identificar cambios en la expresión de los genes que codifican los diferentes P450s. Para ello es necesario asumir que los cambios en el contenido de un mRNA específico son un reflejo de alteraciones en los niveles del enzima correspondiente. En general esto es cierto para la mayor parte de los P450s (Figura 6). El CYP2E1 es una notable excep-

ción, ya que su respuesta a la inducción se debe fundamentalmente a una mayor estabilización de la proteína (102). Si bien la medida de los niveles de mRNA no permite determinar la magnitud real de la respuesta que se produce en la actividad, es particularmente útil para aquellos enzimas para los que no se dispone de un ensayo enzimático adecuado. Si se conoce la secuencia del cDNA correspondiente al enzima y se dispone de técnicas de alto rendimiento para la cuantificación de mRNA (p.e. medidas por RT-PCR) se pueden determinar de forma rápida y sensible los efectos inductores en los modelos *in vitro* (p.e. hepatocitos humanos en cultivo) (103,104) (Figura 7). La sensibilidad de los métodos de cuantificación por RT-PCR es tal que permiten realizar experimentos de inducción utilizando un número muy reducido de hepatocitos humanos e incluso utilizando células con muy baja expresión de enzimas P450 (p.e. líneas de hepatoma) (11,105-107).

En los últimos años se ha avanzado notablemente en el conocimiento de los mecanismos implicados en la inducción de los genes P450 y se ha comprobado en que la mayoría de los casos, la inducción está mediada por receptores nucleares. Esta información ha permitido el desarrollo y optimización de ensayos de *reporter-gene* para la identificación predictiva de moléculas que capaces de unirse y activar estos receptores nucleares (108-110). Estos ensayos basados en modelos mecanísticos son herramientas muy prometedoras para el análisis rápido de un elevado número de moléculas. Sin embargo los hepatocitos humanos continúan siendo el único modelo *in vitro* que permite una comprobación definitiva del potencial inductor del compuesto.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Garattini, S. (1994) Perspectives in the field of drug metabolism. *Drug Metab Rev* **26**, 537-573.
- (2) Gómez-Lechón MJ (2004) Citocromo P-450 extrahepático. En: Citocromo P-450 (M. Cascales y MJ. Gómez-Lechón, eds) Real Academia Nacional de Farmacia/Instituto de España. Madrid. pp 263-280.
- (3) Villar del Fresno, A. Bermejo, P y Martín-Aragón, S (2004) Aspectos Farmacológicos del citocromo P-450 (M. Cascales y MJ Gómez-Lechón, eds) Real Academia Nacional de Farmacia/Instituto de España. Madrid. pp 361-386.
- (4) Meyer, U. & Zanger, U. (1997) Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* **37**, 269-296.

- (5) Prentis, R.A., Lis, Y. & Walker S.R. (1988) Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985). *Brit J Clin Pharmacol* **25**, 387-396.
- (6) Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C. & Nebert, D.W. (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**, 1-42.
- (7) Donato, M.T., Castell, J.V. & Gómez-Lechón, M.J. (1999) Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices: comparison with other hepatic cellular models. *J Hepatol* **31**, 542-549.
- (8) Chen, Q., Galleano, M. & Cederbaum, A.I. (1998) Cytotoxicity and apoptosis produced by arachidonic acid in HepG2 cells overexpressing human cytochrome P-4502E1. *Alcohol Clin Exp Res* **22**, 782-784.
- (9) Rodrigues, A.D. & Wong, S.L. (1997) Application of human liver microsomes in metabolism-based drug-drug interactions: in vitro-in vivo correlations and the Abbott Laboratories experience. *Adv Pharmacol* **43**, 65-101.
- (10) Pearce, R.E., McIntyre, C.J., Madan, A., Sanzgiri, U., Draper, A.J., Bullock, P.L., Cook, D.C., Burton, L.A., Latham, J., Nevins, C. & Parkinson, A. (1996) Effects of freezing, thawing, and storing human liver microsomes on cytochrome P450 activity. *Arch Biochem Biophys* **331**, 145-169.
- (11) Rodríguez-Antona, C., Donato, M.T., Pareja, E., Gómez-Lechón, M.J. & Castell, J.V. (2001) Cytochrome P-450 mRNA expression in human liver and its relationship with enzyme activity. *Arch Biochem Biophys* **393**, 308-315.
- (12) Crespi, C.L., Gonzalez, F.J., Steimel, D.T., Turner, T.R., Gelboin, H.V., Penman, B.W., & Langenbach, R. (1991): A metabolically competent human cell line expressing five cDNAs encoding procarcinogen-activating enzymes: application to mutagenicity testing. *Chem Res Toxicol* **4**, 566-572.
- (13) Doehmer, J., Wolfel, C., Dogra, S., Doehmer, C., Seidel, A., Platt, K.L., Oesch, F., & Glatt, H.R. (1992) Applications of stable V79-derived cell lines expressing rat cytochromes P4501A1, 1A2, and 2B1. *Xenobiotica* **22**, 1093-1099.
- (14) Bort R., Ponsoda, X., Jover, R., Gómez-Lechón, M.J. & Castell J. V. (1999) Diclofenac toxicity to hepatocytes: A role for drug metabolism in cell toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* **288**, 65-72.
- (15) Guillouzo, A., & Chesné, C. (1996): Cell culture models of epithelial tissues: a practical approach. AJ Shaw, ed, Oxford University Press, Oxford. pp. 67-85.
- (16) Gómez-Lechón M.J., Donato, T., Ponsoda, X., Fabra, R., Trullenque, R. & Castell, J. V. (1997) Isolation, culture and use of human hepatocytes in drug research.

- En: *In Vitro Methods in Pharmaceutical research..* J. V. Castell & M. J. Gómez-Lechón eds. Academic Press. London pp. 129-154.
- (17) Ferrini, J.B., Ourlin, J.C., Pichard, L., Fabre, G. & Maurel, P. (1998) Human hepatocyte culture. *Methods Mol Biol* **107**, 341-352.
 - (18) Nelson, A.C., Huang, W. & Moody, D.E. (2001): Variables in human liver microsome preparation: impact on the kinetics of l-alpha-acetylmethadol (LAAM) n-demethylation and dextromethorphan O-demethylation. *Drug Metab. Dispos* **29**, 319-325.
 - (19) Gómez-Lechón, M.J., Donato, M.T., Castell, J.V. & Jover, R. (2003) Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Current Drug Metab* **4**, 292-312.
 - (20) Gómez-Lechón, M.J., Donato, M.T., Castell, J.V. & Jover, R. (2004) Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man. *Current Drug Metab* **5**, 443-462.
 - (21) Di Marco, A., Yao, D. & Laufer, R. (2003) Demethylation of radiolabelled dextromethorphan in rat microsomes and intact hepatocytes. *Eur J Biochem* **270**, 37681-3777.
 - (22) Donato, M.T., Castell, J.V. & Gómez-Lechón, M.J. (1995) Effect of model inducers on cytochrome P450 activities of human hepatocytes in primary culture. *Drug Metab Dispos* **23**, 553-558.
 - (23) Li, A.P., Maurel, P., Gómez-Lechón, M.J., Cheng, L.C. & Jurima-Romet, M. (1997) Preclinical evaluation of drug-drug interaction potential: present status of the application of primary human hepatocytes in the evaluation of cytochrome P-450 induction. *Chem-Biol Interac* **107**, 5-16.
 - (24) Ponsoda, X., Pareja, E., Gómez-Lechón, M.J., Fabra, R., Carrasco, E., Trullénque, R. & Castell, J.V. (2001): Drug biotransformation by human hepatocytes. In vitro/in vivo metabolism by cells from the same donor. *J Hepatol* **33**, 19-25.
 - (25) Macé, K., Offord, E.A., y Pfeifer, A.M.A. (1997): *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, J.V. Castell and M.J. Gómez-Lechón, eds. Academic Press, London, pp 433-456.
 - (26) Bort, R., Macé, K., Boobis, A., Gómez-Lechón, M.J., Pfeifer, A. & Castell, J.V. (1999) Hepatic metabolism of diclofenac: role of human CYP in the minor oxidative pathways. *Biochem Pharmacol* **58**, 787-796.
 - (27) Althaus, M., Retzow, A., Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J., Amalou, Z., Rose, T. & Appel, K. (2000) In vitro identification of the cytochrome P450 isoform responsible for the metabolism of alpha-dihydroergocryptine. *Xenobiotica* **30**, 1033-1045.

- (28) Masimirembwa, C.M., Otter, C., Berg, M., Jonsson, M., Leidvik, B., Jonsson, E., Johansson, T., Backman, A., Edlund, A. & Andersson, T.B. (1999) Heterologous expression and kinetic characterization of human cytochromes P-450: validation of a pharmaceutical tool for drug metabolism research. *Drug Metab Dispos* **27**, 1117-1122
- (29) Venkatakrishnan, K., Von Moltke, L.L., Obach, R.S. & Greenblatt, D.J. (2000) Microsomal binding of amitriptyline: effect on estimation of enzyme kinetic parameters in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* **293**, 343-350.
- (30) Rodrigues A.D. (1999) Integrated cytochrome P450 reaction phenotyping: attempting to bridge the gap between cDNA-expressed cytochromes P450 and native human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* **57**, 465-480.
- (31) Yoshitomi, S., Ikemoto, K., Takahashi, J., Miki, H., Namba, M. & Asahi, S. (2001) Establishment of the transformants expressing human cytochrome P450 subtypes in HepG2, and their applications on drug metabolism and toxicology. *Toxicol In Vitro* **15**, 245-256.
- (32) Pfeifer, A.M., Cole, K.E., Smoot, D.T., Waston, A., Groopman, J.D., Shields, P., Vignaud, J.M., Juillerat, M., Lipsky, M.M., Trump, B.F., Lechner, J.F. & Harris, C.C. (1993) Simian virus 40 large tumor antigen-immortalized normal human liver epithelial cells express hepatocyte characteristics and metabolize chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci* **90**, 5123-5127.
- (33) Schippers, I.J., Moshage, H., Roelofsen, H., Müller, M., Heymans, H.A.S., Ruijters, M., & Kuipers, F. (1997) Immortalized human hepatocytes as a tool for the study of hepatocytic (de-) differentiation. *Cell Biol Toxicol* **13**, 375-386.
- (34) Klocke, R., Gómez-Lechón, M.J., Ehrhardt, A., Mendoza-Figueroa, T., Donato, M.T., López-Sevilla, R., Castell, J.V. & Paul, D. (2002) Establishment and characterization of immortal hepatocytes derived from various transgenic mouse lines. *Biochem Biophys Commun* **294**, 864-871.
- (35) Donato, M.T., Klocke, R., Castell, J.V., Stenzel K, Paul, D. & Gómez-Lechón M.J. (2003) Constitutive and inducible expression of CYP enzymes in immortal hepatocytes derived from SV40 transgenic mice. *Xenobiotica* **33**, 459-476.
- (36) Jover R., R. Bort, M.J. Gómez-Lechón & J. V. Castell. (1998) Re-expression of C/EBP- α induces CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genes in HepG2 cells. *FEBS Letters* **431**, 227-230
- (37) Bort, R., R. Jover, Gómez-Lechón, M.J. & Castell, J.V. (2004) Role of hepatocyte nuclear factor 3 gamma in the expression of human CYP2C genes. *Arch Biochem Biophys* **426**, 63-72.
- (38) Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y. & Guengerich, F.P. (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: Studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* **270**, 414-423.

- (39) Pelkonen, O., (2004) Induction and inhibition of cytochrome P-450. En: Citocromo P-450 (M. Cascales y MJ Gómez-Lechón eds) Real Academia Nacional de Farmacia/Instituto de España. Madrid. pp 123-147.
- (40) Lin, J.H. & Lu, A.Y.H. (1998) Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet* **35**, 361-390.
- (41) Smith, G., Stubbins, M.J., Harries, L.W. & Wolf, C.R. (1998) Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily. *Xenobiotica* **28**, 1129-1165.
- (42) Blum, M., Demierre, A., Grant, D., Heim, M. & Meyer, U. (1991) Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans. *Proc Nat Acad Sci USA* **88**, 5237-5241.
- (43) Miras-Portugal, MT y Gualix, J (2004) Polimorfismos de los citocromos P-450. Importancia fisiopatológica y farmacológica. En: Citocromo P-450 (M. Cascales y MJ Gómez-Lechón, eds) Real Academia Nacional de Farmacia/Instituto de España. Madrid. pp 91-122.
- (44) Skoda, R.C., Gonzalez, F.J. y Demierre, A. (1988) Two mutant alleles of the human cytochrome P450 db1 gene (P450 IID1) associated with genetically deficient metabolism of debrisoquine and other drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 5240-5243.
- (45) Kimura, S., Umeno, M., Skoda, R. C., Meyer, U. A. & Gonzalez, F. J. (1989) The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *Am J Hum Genet* **45**, 889-904,.
- (46) Heim, M. H. & Meyer, U. A. (1992) Evolution of a highly polymorphic human cytochrome P450 gene cluster: CYP2D6. *Genomics* **14**, 49-58.
- (47) Wrighton, S. A., Stevens, J. C., Becker G. W. & VandenBranden, M. (1993) Isolation and characterization of human liver cytochrome P4502C19: correlation between 2C19 and S-mephenytoin 4'-hydroxylation. *Arch Biochem Biophys* **306**, 240-245.
- (48) De Morais, S.M.F., Wilkinson, G.R. & Blaisdell, J. (1994) The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J Biol Chem* **269**, 15419-15422.
- (49) Goldstein, J.A., Falletto, M.B., Romkes-Sparks, M., Sullivan, T., Kitareewan, S., Raucy, J.L., Lasker, J.M. & Ghanayem, B.I. (1994) Evidence that CYP2C19 is the major (S)-mephenytoin 4-hydroxylase in humans. *Biochemistry* **33**, 1743-1752.

- (50) Pain, A.J. (1995) Heterogeneity of cytochrome P450 and its toxicological significance. *Hum Exp Toxicol* **14**, 1-7.
- (51) Meyer, U.A. (1992) Drugs in special patient groups: Clinical importance of genetics in drug effects. En: *Clinical Pharmacology Basic Principles of Therapeutics*. (Melmon K.F. y Morelli H.F. Eds.), McGra-Hill, New York, pp. 875-894.
- (52) Ponsoda, X., Bort, R., Jover, R., Gómez-Lechón, M.J. & Castell, J.V. (1999) Increased toxicity of cocaine to human hepatocytes by ethanol. Role of GSH depletion. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 1579-1585.
- (53) Castell, J.V., Gómez-Lechón, M. J., Ponsoda, X. & Bort, R. (1997) In vitro investigation of the molecular mechanisms of hepatotoxicity. En: *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*. J. V. Castell & M. J. Gómez-Lechón, eds. Academic Press. London. pp. 375-432.
- (54) Guillén I., Donato, M.T., Jover, R., Castell, J.V., Fabra, R., Trullenque, R. y Gómez-Lechón, M.J. (1998) Oncostatin M down-regulates basal and induced cytochromes P450 in human hepatocytes. *J Pharm Exp Ther* **285**,127-134.
- (55) Gossen, M. & Bujark, H. (1992) Tight control of gene expression in mamalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 5547-5551.
- (56) Resnitzky, D., Gossenm, M., Bujard, H. & Reed, S.I. (1994) Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* **14**, 1669-1679.
- (57) Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. Y Bujard, H. (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**, 1766-1769.
- (58) Castell, J.V., Hernández, D., Gómez-Foix, A.M., Guillén, I., Donato, T. y Gómez-Lechón, M.J. (1998) Adenovirus-mediated gene transfer into human hepatocytes: analysis of the biochemical functionality of transduced cells. *Gene Ther* **4**, 455-464
- (59) No, D., Yao, T.P. & Evans, R.M. Ecdysone-inducible gene expression in mamalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 3346-3355.
- (60) Stuart, G.W., Searle, P.F., Chen, H.Y., Brinster, R.L. & Palmiter, R.D. (1984) A 12-base-pair DNA motif that is repeated several times in metallothionein gene promoters confers metal regulation to a heterologous gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 7318-7322.
- (61) Ito, K., Iwatsubo, T., Kanamitsu, S., Ueda, K., Suzuki, H. & Sugiyama, Y. (1998) Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacol Rev* **50**, 387-412.

- (62) Guengerich, F.P. (1999) Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **39**, 1-17
- (63) De Wildt, S.N., Kearns, G.L., Leeder, J.S. & van den Anker, J.N. (1999) Cytochrome P450 3A ontogeny and drug disposition. *Clin Pharmacokinet* **37**, 485-505.
- (64) Murray, M. (1984) Mechanisms of the inhibition of cytochrome P-450-mediated drug oxidation by therapeutic agents. *Drug Metab Rev* **18**, 8155-8149.
- (65) Chang, T.K., Gonzalez, F.J. & Waxman, D.J. (1994) Evaluation of triacetyloleandomycin, alpha-naphthoflavone and diethyldithiocarbamate as selective chemical probes for inhibition of human cytochromes P450. *Arch Biochem Biophys* **311**, 437-442.
- (66) Donato, M.T. & Castell, J.V. (2003) Strategies and molecular probes to investigate the role of cytochrome p450 in drug metabolism. *Clin Pharmacokinet* **42**, 153-178.
- (67) López-García, M.P., Dansette, P.M. & Mansuy, D. (1993) Thiophene derivatives as new mechanism-based inhibitors of cytochromes P-450: inactivation of yeast-expressed human liver cytochrome P-450 2C9 by tienilic acid. *Biochemistry* **33**, 166-175.
- (68) Koenigs, L.L., Peter, R.M., Thompson, S.J., Rettie, A.E. & Trager, W.F. (1997) Mechanism-based inactivation of human liver cytochrome P450 2A6 by 8-methoxypsoralen. *Drug Metab Dispos* **25**, 1407-1415.
- (69) Ronis, M.J. & Ingelman-Sundberg, M. (1999) Induction of human drug-metabolizing enzymes: mechanisms and implications. En: *Handbook of drug metabolism*, (Woolf, T.F. Ed.) Marcel Dekker Inc, New York, pp. 239-262.
- (70) Finch, C.K., Chrisman, C.R., Baciewicz, A.M. & Self, T.H. (2002) Rifampin and rifabutin drug interactions: an update. *Arch Intern Med* **162**, 985-992.
- (71) Strolin-Benedetti, M. & Dostert, P. (1994) Induction and autoinduction properties of rifamycin derivatives. *Environ Health Perspect* **104**, 101-105.
- (72) Kocarek, T.A., Schuetz, E.G., Strom, S.C., Fisher, R.A. & Guzelian, P.S. (1995) Comparative analysis of cytochrome P450 3A induction in primary cultures of rat, rabbit, and human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **23**, 415-421.
- (73) Donato, M.T., Castell, J.V. & Gómez-Lechón, M.J. (1998) The coumarin 7-hydroxylation microassay in living hepatic cells in culture. *ATLA* **26**, 213-223.
- (74) Bjornsson, T.D., Callaghan, J.T., Einolf, H.J., Fischer, V., Gan, L., Grimm, S., Kao, J., King, P.S., Miwa, G., Ni, L., Kumar, G., McLeod, J., Obach, R.S., Roberts, S., Roe, A., Shah, A., Snikeris, F., Sullivan, J.T., Tweedie, D., Vega, J.M., Walsh, J. & Wrighton, S.A. (2003) The conduct of in vitro drug-drug interaction studies: a pharmaceutical research and manufacturers of America (PhRMA) perspective. *Drug Metab Dispos* **31**, 815-832.

- (75) Tucker, G.T., Houston, J.B. & Huang, S.M. (2001) Optimizing drug development: strategies to assess drug metabolism/transporter interaction potential-toward a consensus. *Pharma Res* **18**, 1071-1080.
- (76) Donato, M.T., Jimenez, N., Castell, J.V. & Gómez-Lechon, M.J. (2004) Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expression individual human P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* **32**, 699-706.
- (77) Walsky, R.L. & Obach, R.S. (2004) Validated assays for human cytochrome P450 activities. *Drug Metab Dispos* **32**, 647-660.
- (78) Donato, M.T., Gómez-Lechón, M.J. & Castell, J.V. (1993). A microassay for measuring cytochrome P450IA1 and P450IIB1 activities in intact human and rat hepatocytes cultured on 96-well plates. *Anal Biochem* **213**, 29-33.
- (79) Crespi, C.L., Miller, V.P. & Penman, B.W (1997) Microtiter plate assay for inhibition of human drug-metabolizing cytochromes P450. *Anal Biochem* **248**, 188-190.
- (80) Stresser, D.M., Turner, S.D., Blanchard, A.P., Miller, V.P. & Crespi, C.L. (2002) Cytochrome P450 fluorometric substrates: identification of isoform-selective probes for rat CYP2D2 and human CYP3A4. *Drug Metab Dispos* **30**, 845-852.
- (81) Cohen, L.H., Remley, M.J., Raunig, D. & Vaz, A.D.N. (2003) In vitro drug interactions of cytochromes P450: an evaluation of fluorogenic to conventional substrates. *Drug Metab Dispos* **31**, 1005-1015.
- (82) Burke, M.D., Thompson, S., Elcombe, C.R., Halpert, J., Haaparanta, T. & Mayer, R.T. (1985) Ethoxy-, pentoxy-, and benzyloxyphenoxones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem Pharmacol* **34**, 3337-3345.
- (83) Stresser, D.M., Blanchard, A.P., Turner, S.D., Erve, J.C., Dandeneau, A.A., Miller, V.P. & Crespi, C.L. (2000) Substrate-dependent modulation of CYP3A4 catalytic activity: analysis of 27 test compounds with four fluorimetric substrates. *Drug Metab Dispos* **28**, 1440-1448.
- (84) Ekins, S., VandenBranden, M., Ring, B.J. & Wrighton, S.A. (1997) Examination of purported probes of human CYP2B6. *Pharmacogenetic*. **7**, 165-179.
- (85) Venhurs, J., Onderwater, R.C.A., Meerman, J.H.N., Vermeulen, N.P.E. & Commandeur, J.N.M. (2000) Evaluation of a novel high-throughput assay for cytochrome P450 2D6 using 7-methoxy-4-(aminophenyl)-coumarin. *Eur J Pharmaceut Sci* **12**, 151-158.
- (86) Bapiro, T.E., Egnell, A.C., Hasler, J.A. & Masimirembwa, C.M. (2001) Application of higher throughput screening (HTS) inhibition assays to evaluate the interaction of antiparasitic drugs with cytochrome P450s. *Drug Metab Dispos* **29**, 30-35.

- (87) Price, R.J., Surry, D., Renwick, A.B., Meneses-Lorente, G., Lake, B.G. & Evans, D.C. (2000) CYP isoform induction screening in 96-well plates: use of 7-benzyloxy-4-trifluoromethyl-coumarin as a substrate for studies with rat hepatocytes. *Xenobiotica* **30**, 781-795.
- (88) Renwick, A.B., Surrty, D., Price, R.J., Lake, B.G. & Evans, D.C. (2000) Metabolism of 7-benzyloxy-4-trifluoromethyl-coumarin by human hepatic cytochrome P450 isoforms. *Xenobiotica* **30**, 955-969.
- (89) Chauret, N., Dobss, B., Lackman, R.L., Bateman, K., Nicoll-Griffith, D.A., Stresser, D.M., Ackermann, J.M., Turner, S.D., Miller, V. & Crespi, C.L. (2001) The use of 3-[2-*N,N*-diethyl-*N*-methylammonium)ethyl]-7-methoxy-4-methylcoumarin (AMMC) as a specific CYP2D6 probe in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **29**, 1196-1200.
- (90) Chauret, N., Tremblay, N., Lackman, R.L., Gauthier, J.Y., Silva, J.M., Marois, J., Yergey, J.A. & Nicoll-Griffith, D.A. (1999) Description of a 96-well plate assay to measure cytochrome P450A3 inhibition in human liver microsomes using a selective fluorescent probe. *Anal Biochem* **276**, 215-226.
- (91) Yun, C., Shimada, T. & Guengerich F.P. (1991) Purification and characterizations of human liver microsomal cytochrome P-450 2A6. *Biochem Pharmacol* **40**, 679-685.
- (92) Nerurkar, P.V., Park, S.S., Thomas, P.E., Nims, R.W. & Lubet, R.A. (1993) Methoxyresorufin and benzyloxyresorufin: substrates preferentially metabolized by cytochromes P4501A2 and 2B, respectively, in the rat and mouse. *Biochem Pharmacol* **46**, 933-943.
- (93) Renwick, A.B., Lewis, D.F.V., Fulford, S., Surry, D., Williams, B., Worboys, P.D., Cai, X., Wang, R.W., Price, R.J., Lake, B.G. & Evans, D.C. (2001) Metabolism of 2,5-bis(trifluoromethyl)-7-benzyloxy-4-trifluoromethyl-coumarin by human hepatic CYP isoforms: evidence for selectivity towards CYP3A4. *Xenobiotica* **31**, 187-204.
- (94) Yamamoto, T., Suzyki, A. & Kohno, Y (2003) High-throughput screening to estimate single or multiple enzymes involved in drug metabolism: microtitre plate assay using a combination of recombinant CYP2D6 and human liver microsomes. *Xenobiotica* **8**, 823-829.
- (95) Yan, Z., Rafferty, B., Caldwell, G.W. & Masucci, J.A. (2002) Rapidly distinguishing reversible and irreversible CYP450 inhibitors by using fluorimetric kinetic analyses. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **27**, 281-287.
- (96) Yamamoto, T., Suzyki, A. & Kohno, Y. (2002) Application of microtiter plate assay to evaluate inhibitory effects of various compounds on nine cytochrome P450 isoforms and to estimate their inhibition patterns. *Drug Metabol Pharmacokin* **17**, 438-448.

- (97) Palamanda, J.R., Favreau, L., Lin, C.C. & Nomeir, A.A. (1998) Validation of a rapid microtiter plate assay to conduct cytochrome P450 2D6 enzyme inhibition studies. *Drug Discov Today* **3**, 466-470.
- (98) Edwards, R.J., Price, R.J., Watts, P., Renwick, A.B., Tredger, J.M., Boobis, A.R. & Lake, B.G. (2003) Induction of cytochrome P450 enzymes in cultured precision-cut human liver slices. *Drug Metab Dispos* **31**, 282-288.
- (99) Lecluyse, E., Madan A., Hamilton, G., Carroll, K., DeHaan, R. & Parkinson A. (2000) Expresión and regulation of cytochrome P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes. *J Biochem Mol Toxicol* **14**, 177-188.
- (100) Madan, A., Graham, P.A., Carroll, K.M., Mudra, R., Mudra, D.R., Burton, L.A., Krueger, L.A., Downey, A.D., Czerwinski, M., Forster, J., Ribadeneira, M.D., Gan, L.S., LeCluyse, E.L., Zech, K., Robertson, P., Koch, P., Antonian, L., Wagner, G., Yu, L. & Parkinson, A. (2003) Effects of prototypical microsomal enzyme inducers on cytochrome P450 expression in cultured human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **31**, 421-431.
- (101) Meunier, V., Bourrie, M., Julian, B., Marti, E., Guillou, F., Berger, Y. & Fabre, G. (2000) Expression and induction of CYP1A1/1A2, CYP2A6 and CYP3A4 in primary cultures of human hepatocytes: a 10-year follow-up. *Xenobiotica* **30**, 589-607.
- (102) Fuhr U. (2000) Induction of drug metabolising enzymes: pharmacokinetic and toxicological consequences in humans. *Clin Pharmacokinet* **38**, 493-504.
- (103) Rodríguez-Antona, C., Jover, R., Gómez-Lechón, M.J. & Castell, J.V. (2000). Quantitative RT-PCR measurement of human cytochrome P-450s: application to drug induction studies. *Arch Biochem Biophys* **376**, 109-116.
- (104) Pérez, G., Tabares, B., Jover, R., Gómez-Lechón, M.J. & Castell, J.V. (2003) Semi-automatic quantitative RT-PCR to measure CYP induction by drugs in human hepatocytes. *Toxic in Vitro* **17**, 643-649.
- (105) Bowen, W.P., Carey, J.E., Miah, A., McMurray, H.F., Munday, P.W., James, R.S., Coleman, R.A. & Brown, A.M. (2000). Measurement of cytochrome P450 gene induction in human hepatocytes using quantitative real-time transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug Metab Dispos* **28**, 781-788.
- (106) Gerbal-Chaloin, S., Pascussi, J.M., Pichard-Garcia, L., Daujat, M., Waechter, F., Fabre, J.M., Carrere, N. & Maurel, P. (2001) Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture. *Drug Metab Dispos* **29**, 242-251.
- (107) Sumida, A., Fukunen S, Yamamoto, I. & Azuma, J. (2001) Quantitative analysis of constitutive and inducible CYPs mRNA expression in the HepG2 cell line using reverse transcription-competitive PCR. *Biochem Biophys Res Commun* **267**, 765-760.

- (108) El-Sankary, W., Gibson, G.G., Ayrton, A. & Plant, N. (2001) Use of a reporter gene assay to predict and rank the potency and efficacy of CYP3A4 inducers. *Drug Metab Dispos* **29**, 1499-1504.
- (109) Raucy, J.L., Mueller, L.; Duan, K.; Allen, S.W.; Strom, S. & Lasker, J.M. (2002) Expression and induction of CYP2C P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **302**, 475-482.
- (110) Schuetz, E., Lan, L., Yasuda, K., Kim, R., Kocarek, T.A., Schuetz, J. & Strom, S. (2002) Development of a real-time in vivo transcription assay: application reveals pregnane X receptor-mediated induction of CYP3A4 by cancer chemotherapeutic agents. *Mol Pharmacol* **62**, 439-445.